

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
KEEMIA INSTITUUT

Rain Laidma
Biosensor sinivetika toksiini mikrotsüstiin-LR määramiseks
Bakalaureusetöö (12EAP)

Juhendajad: Toonika Rinken, Phd
Edith Viirlaid, MSc
Eerik Jõgi, MSc

Kaitsmisele lubatud:

Juhendaja: _____

Tartu 2019

Biosensor sinivetika toksiini mikrotsüstiin-LR määramiseks

Käesolevas töös konstrueeriti antikeha-aptameer tuvastussüsteemil põhinev biosensor sinivetika toksiini mikrotsüstiin-LR määramiseks. Mikrotsüstiin-LR on fütoplanktonite perekonna *Microcystis* poolt toodetud hepatotoksiin, mis on keemiliselt väga stabiilne ning mille poolestusaeg looduslikes keskkondades võib ulatuda kuni 120 päevani. Seepärast on oluline tuvastada ka peale sinivetikate massilist vohamist mikrotsüstiin-LR kontsentratsioon veekogudes, vältimaks toksiini sattumist kõrgematesse organismidesse. Biosensorid võimaldavad kiirelt testida toksiini kontsentratsiooni proovides, elimineerides vajaduse käesoleval ajal kasutusel olevate kulukate ning aeganõudvate testide järgi.

Märksõnad: *biosensor, mikrotsüstiin-LR, sinivetikas, aptameer, antikeha.*

CERCS: T270 Keskkonnatehnoloogiaga, reostuskontroll.

Biosensor for the detection of cyanobacterial toxin microcystin-LR

The purpose of this work was to develop an antibody-aptamer based biosensor for the detection of cyanobacterial toxin microcystin-LR. Microcystin-LR, which is chemically stable and with a half-life up to 120 days, is classified as a hepatotoxin and is produced by the phytoplankton family *Microcystis*. On those reasons, it is important to detect microcystin-LR concentration in water bodies after the algal bloom has occurred to prevent the toxin uptake by higher organisms. Biosensor offers the ability to test toxin concentrations in samples fast by eliminating the need for expensive and time-consuming tests that are used today.

Keywords: *biosensor, microcystin-LR, cyanobacteria, aptamer, antibody.*

CERCS: T270, Environmental technology, pollution control.

Sisukord	
Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus.....	5
1. Kirjanduse ülevaade.....	6
1.1 Tsüanobakterite levik ja nende poolt põhjustatavad probleemid.....	6
1.1.1 Veekogude õitsemine ja seda soodustavad tegurid.....	6
1.1.2 Tsüanobakterite poolt põhjustatavad probleemid	7
1.2 Tsüanotoksiinid.....	7
1.2.1 Mikrotsüstiin-LR.....	8
1.3 Meetodid tsüanotoksiinide määramiseks	9
1.3.1 Mikroskoopia	9
1.3.2 Molekulaarsed meetodid.....	10
1.3.3 Keemilised meetodid	10
1.3.4 Biokeemilised meetodid.....	10
1.4 Biosensorid mikrotsüstiin-LR määramiseks	11
2. Eksperimentaalne osa.....	15
2.1 Kasutatud reagentid.....	15
2.2 Kasutatud aparatuur	15
2.3 Kasutatud meetodikad	16
2.3.1 Antikehade immobiliseerimine graanulitele	16
2.3.2 Mõõtmiste läbiviimise protokoll.....	17
3. Tulemused ja arutelu.....	20
3.1 Biosensorsüsteemi disainimine MC-LR määramiseks	20
3.1.1 Aptameeriga seotud fluorestsentsmarkeri AlexaFluor 647 spektrite määramine	21
3.2 Mõõteprotokolli optimeerimine	21
3.2.1 Aptameeri kontsentratsiooni optimeerimine.....	21
3.2.2 Biosensori väljundsignaali sõltuvus mõõdetava signaali detekteerimise ajast	22
3.3 Mikrotsüstiin-LR kontsentratsiooni määramine	23
Kokkuvõte.....	26
Summary	27
Kasutatud kirjandus	28
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	32

Kasutatud lühendid

MC-LR – Mikrotsüstiin-LR (*Microcystin-LR*)

FOCB – Kiudoptiline kemoluminestsents biosensor (*Fiber Optical Chemiluminescent Biosensor*)

LOD – Avastamiskiir (*Limit Of Detection*)

TOPA – Orgaanilise saaste jälje analüsaator (*Trace Organic Pollutant Analyzer*)

CL-MADAG – Mitmekanaline kemoluminestsents immunosensor (*Chemiluminescence Multichannel Immunosensor*)

MSPE – Magnetiline tahke faasi ekstraktsioon (*Magnetic Solid Phase Extraction*)

FPIA – Fluorestseeriv polarisatsiooni immunoanalüüs (*Fluorescence Polarization Immunoassay*)

PBS - Fosfaatpuhevr, millele lisatud NaCl (*Phosphate-buffered saline*)

Rpm – pööret minutis (*Rotations per minute*)

DNA – desoksüribonukleiinhape (*Deoxyribonucleic acid*)

RNA – Ribonukleiinhape (*Ribonucleic acid*)

BIA – Graanulisestusanalüüs (*Bead Injection Analysis*)

ELISA – ensüüm-immunosorptsioon analüüs (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Sissejuhatus

Sinivetikate erinevad perekonnad on võimelised tootma mitmeid erinevaid toksine, neist enim levinud on tsüanobakterite perekonna *Microcystis* poolt toodetud mikrotsüstiinid. Mikrotsüstiin-LR (MC-LR), olles kõige toksilisem ning enim toodetud toksiin sinivetikate poolt on oma olemuselt hepatotoksiin, kahjustades maksarakke ning halvimal juhul põhjustades maksapuudulikkust.

Sinivetikate õitsemine, mille käigus toimub nende massiline paljunemine, toob endaga kaasa mitmeid probleeme, alates vee hägustamisest kuni toksiinide vabastamiseni veekogudesse. Olles keemiliselt väga stabiilne ning omades poolestusaega kuni 120 päeva [1], põhjustab MC-LR mitmeid probleeme ning väljakutseid nii tervislikust kui ka majanduslikust seisukohast. Tänapäeval kasutusel olevad kulukad ja aeganõudvad meetodid oleks vaja kiire ning lihtsasti opereeritava aparatuuriga asendada.

Üheks võimaluseks on biosensorite kasutuselevõtt. Biosensorid on kiired ning lihtsasti kasutatavad ning neil on potentsiaali asendada praegu kasutusel olevad meetodid.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli konstrueerida antikeha-aptameer baasil põhinev biosensor mikrotsüstiin-LR määramiseks ja optimeerida mõõtmismetoodikat.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Tsüanobakterite levik ja nende poolt põhjustatavad probleemid

Tsüanobakterid (*Cyanobacteria*) ehk sinivetikad on autotroofsete bakterite hõimkond, mida võib leida peamiselt veekogudes, aga ka niiskel pinnasel, samblikes, käsnades, puukoorel, lompides ja isegi kuumaveeallikates. Sinivetikate hõimkonnas on umbes 2000 eri liiki ning ligi 400 neist on praeguseks tuvastatud ka Eestis [2].

Tavaliselt sinivetikad inimesele ohtlikud ei ole, kuid ettevaatlik tuleb olla nende massiesinemise ehk õitsemise ajal, sest pärast õitsemist eritavad lagunevad sinivetikad erinevaid tsüanotoksiine [2].

1.1.1 Veekogude õitsemine ja seda soodustavad tegurid

Veekogude õitsemiseks loetakse sündmust, kus lühikese aja jooksul paljuneb üks või mitu erinevat fütoplanktoni liiki [3]. Tsüanobakterid kuuluvad fütoplanktonite hulka, kuna nad on võimelised fotosünteesiks.

Sinivetikate õitsemise esinemine on tingitud mitmetest erinevatest keskkonnatingimuste kokkulangemisest. Peamised tingimused, mis tsüanobakterite vohamist soodustavad on valguse intensiivsus, sobiva temperatuuri ning toitainete olemasolu. Lisaks mõjutab bakterite kasvu vee keemiline koostis (pH, soolsus) ning veekogu hüdroloogia. Määrava tähtsusega sinivetikatele fotosünteesi toimumiseks kui ka nende paljunemiseks on valguse intensiivsus. Kuna sinivetikad vajavad oma elutegevuseks vähe energiat, suunatakse üleliigne energia paljunemiseks ja nõrgema valguse intensiivsuse esinemisel on neil täheldatud kiiremat paljunemismäära kui teistel fütoplanktonitel [4].

Sinivetikate vohamist soodustab ka piisavalt kõrge veetemperatuur. Enamus tsüanobakterite liike vajavad vett, mille temperatuur on vähemalt 25°C. Globaalne soojenemine suurendab õitsemise tekke riski ning pikendab õitsemise kestvust [5].

Tsüanobakterite õitsemised toimuvad peamiselt eutrofeerunud veekogudes, kus lämmastiku ja fosfori suhe jääb 10 kuni 15 vahele. Vohamiste esinemine korreleerub paremini lämmastiku ja fosfori üldkontsentratsiooniga, kui lämmastiku ja fosfori suhtega [5]. Lisaks on tsüanobakterid võimelised siduma ka õhulämmastikku, mis samuti soodustab suuremate vohamiste tekkimist [6].

1.1.2 Tsüanobakterite poolt põhjustatavad probleemid

Tsüanobakterid esinevad veekogudes alati, probleemid tekivad siis, kui veekogudes tekivad soodsad olud massiliseks paljunemiseks. Peamine märgatav probleem, mis õitsemisega kaasneb on vee läbipaistvuse langus. Tsüanobakterid, olles võimelised veekogude pinnal hõljuma, suruvad pinnakihtides oleva loomse hõljumi sügavamatesse kihtidesse [7].

Läbipaistvuse languse tõttu väheneb hapniku kontsentratsioon alumistes veekihtides soodustades anaeroobsete tsoonide teket, lämmatades kalad. Anaeroobsetes tsoonides käivituvad keemilised protsessid, mis tarbivad vees leiduvat CO₂-te. CO₂ tarbimise tõttu tõuseb veekogu pH, tuues endaga kaasa ammoniaagi eraldumise [7].

Lisaks keskkondlikele probleemidele põhjustavad tsüanobakterid majanduslikku kahju. Õitsemised avalikes randades loovad olukorra, kus rand on vaja sulgeda, või rakendada kulukaid meetmeid randade puhastamiseks. Õitsemise korral joogivee reservuaaris, tekitab olukorra kus joogivee puhastamiseks peab kasutusele võtma suuremas hulgas kemikaale, näiteks kloor [8].

1.2 Tsüanotoksiinid

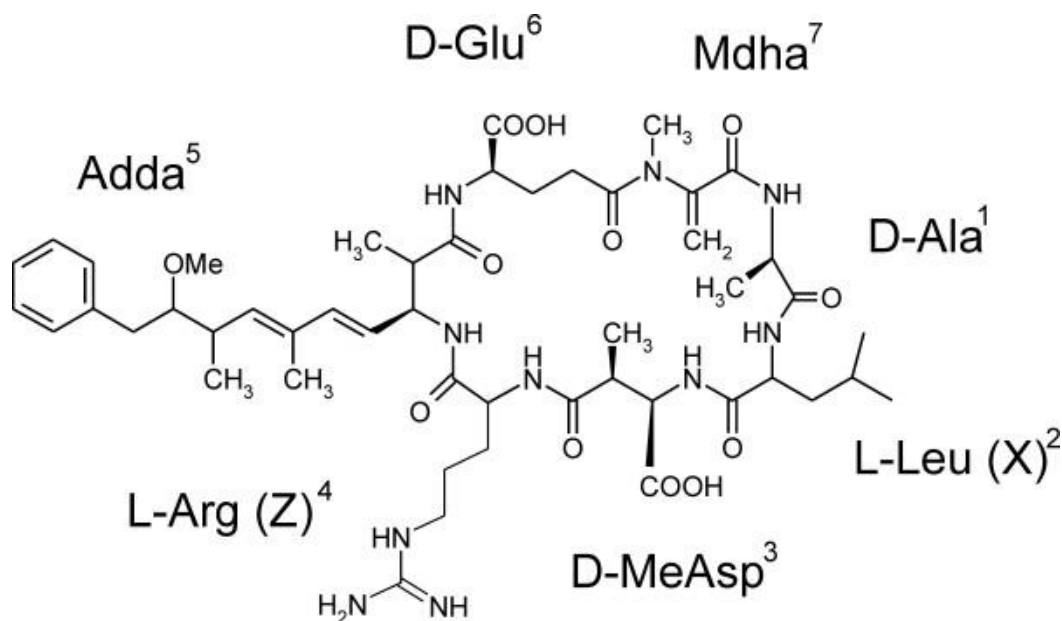
Nagu eespool öeldud, võivad sinivetikad produtseerida erinevaid toksine, kusjuures erinevatel toksiinidel on erinev keemiline struktuur ning omadused [5]. Toksiinide lihtsamaks eristamiseks, jaotatakse need mõju alusel neljaks suuremaks rühmaks [9].

- Hepatotoksiinid, mis omavad kahjulikku mõju maksale ning mida produtseerivad tsüanobakterite *Microcystis* ja *Nodularia* perekonna liigid.
- Tsütotoksiinid, millel on nii hepatotoksiline mõju kui ka neurotoksiline mõju (*Cylindrospermopsin*).
- Neurotoksiinid, millel on kahjustav mõju närvisüsteemile (*Anatoxins*, *Saxitoxins*, *β-Methylamino-L-Alanine* ehk *BMAA*).
- Dermatotoksiinid, mis põhjustavad nahaärritusi (*Lypopolysaccharide*, *Lyngbyatoxins*, *Aplysiatoxin*).

Peamisi tsüanobakterite poolt toodetavaid hepatotoksiine, mis kahjustavad maksarakke ning võivad põhjustada maksapuudulikkust nimetatakse mikrotsüstiinideks [10]. Lisaks on tähendatud hepatotoksiinidel ka kantserogeensed omadused [11].

1.2.1 Mikrotsüstiin-LR

Kõige toksilisem tsüanobakterite poolt toodetud hepatotoksiinidest on mikrotsüstiin-LR. MC-LR, keemilise brutovalemiga $C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$ on tsükliline heptapeptiid, mis koosneb seitsmest erinevast aminohappe jäägist. Kokku on tänapäeval tuvastatud üle 90 erineva mikrotsüstiini vormi. Erivormid sõltuvad erinevate α -aminohapete paiknemisest vastavalt tsükli teisel ja neljandal positsioonil [12]. MC-LR on oma nime saanud leutsiini ning arginiini järgi, mis asetsevad mikrotsüstiini molekulis vastavalt X ning Z positsioonidel (joonis 1). Süstemaatiline MC-LR nimetus IUPAC järgi on (5R,8S,11R,12S,15S,18S,19S,22R)-15-[3-(diaminometüleenamino)propüül]-18-[(1E,3E,5S,6S)-6-metoksü-3,5-dimetüül-7-fenüülhepta-1,3-dienüül]-1,5,12,19-tetrametüül-2-metülideen-8-(2-metüülpropüül)-3,6,9,13,16,20,25-heptaokso-1,4,7,10,14,17,21-heptasatsüklopentakosaan-11,22-dikarboksüülhape [13].



Joonis 1. Sinivetikatoksiin mikrotsüstiin-LR [14].

MC-LR, nagu ka teised mikrotsüstiini vormid, on keemiliselt väga stabiilne. Stabiilsuse põhjuseks arvatakse olevat tema tsükliline struktuur, mis võimaldab terviklikuks jääda peale mitmeid tunde keetmist ning aastaid kuivas, toatemperatuuriga kohas hoiustamist [15].

Mikroobide populatsioonis seevastu on avastatud bakterikultuure, mis on võimelised lagundama MC-LR molekuli [16]. Lisaks bakteritele on võimalik kasutada kombineeritud ultraviolettkiirguse ja vesinikperoksiidi tehnoloogiat (UV/H₂O₂), mille efektiivsust on tõestatud keemiliselt stabiilse MC-LR-i lagundamisel.. Uuringus järeldati, et OH radikaali otsene fotolüüs UV kiirguse toimel on MC-LR molekuli degradeerumise peamine põhjus. UV/H₂O₂ meetodit peetakse tehnoloogiaks, mida on võimalik kasutada MC-LR-iga saastunud veekogude puhastamiseks [17].

1.3 Meetodid tsüanotoksiinide määramiseks

Tsüanotoksiinide poolt põhjustatud haiguste vältimiseks on vajalik toksiinide õigeaegne tuvastamine veekogudes. Tuvastamise meetodid peaksid olema võimalikult kiired ja lihtsasti kasutatavad ning lisaks ka tundlikud, suutmaks tuvastada toksiine kvantitatiivselt. Praegu kasutusel olevad meetodite rakendamiseks vajatakse kas kallist aparatuuri ja oskusega tööjõudu, või on meetodid madala efektiivsuse- ja tundlikkusega [9].

1.3.1 Mikroskoopia

Mikroskoopia kasutamine on vanim viis sinivetikate tuvastamiseks veekogudes. Antud meetodi eelisteks loetakse odavat opereerimiskulu ja kiiret tulemust ning võimalust määrata mikroorganisme kvantitatiivselt ning taksonoomiliselt. Suurim probleem selle meetodi kasutamisel seisneb mitte-toksiliste ja toksiliste tsüanobakterite mitteeristamises. Antud negatiivne aspekt ei võimalda teavitada öitsemise ohtlikkusest [9].

Rakkude loendamiseks kasutatakse kahte erinevat mikroskoopilist meetodit: fluorestsentsmikroskoopi või invertmikroskoopi. Fluorestsentsmikroskoobi puhul kasutatakse märgistamiseks värve, millega on võimalik tsüanobaktereid identifitseerida ning kvantifitseerida. Lisaks on võimalik eristada autotroofseid ja heterotroofseid rakke. Kasutades sedimentatsioonikambrit, on võimalik invertmikroskoobiga analüüsida fütoplanktonite suhtelist kogust veeproovis. See meetod võimaldab spetsialistidel määrata isegi sinivetikaid kuni perekonnani või liigini. Mõlema meetodi puuduseks on madal tundlikkus. Valgusmikroskoobil on väike eraldusvõime, mistõttu ei ole võimalik määrata sinivetikate rakke, kuna nad kuuluvad bakterite hulka. Lisaks raskendab õigete tulemuste saamist rakkude ebaühtlane paiknemine proovis [9].

1.3.2 Molekulaarsed meetodid

Molekulaarsete meetodite tööpõhimõte seisneb tsüanobakterites olevate spetsiifiliste geenide tuvastamises. Tuvastatakse gene, mis vastutavad toksiinide sünteesimise eest, või gene mis vastutavad raku elutegevuse eest. Molekulaarsete meetodite, nagu PCR (polümeraasi ahelreaktsioon) eeliseks loetakse sensitiivsust ning kiirust, aga ka kõrget spetsiifilisust. Antud meetodi puuduseks peetakse tulemuste erinevust võrreldes teiste meetoditega, nagu keemilised või biokeemilised meetodid. Otsides toksiooni sünteesiga tegelevaid gene rakkudes ei tähenda see alati seda, et antud rakk toksiooni sünteesimisega tegeleb [18].

1.3.3 Keemilised meetodid

Keemilisi meetodeid kasutatakse enim molekulaarsete meetodite tulemuste valideerimisel. Molekulaarne meetod hindab toksiinide esinemise potentsiaali, peale mida kasutatakse erinevaid keemilisi meetodeid nende tulemuste kinnitamiseks [18].

Kõige enam kasutatakse kõrgefektiivset vedelikkromatograafia (HPLC) tehnikat, mis on kombineeritud kas ultraviolet (UV) või fotodiod (PDA) detektoriga. Lisaks kasutatakse fluorestsents detektorit (FLD) erinevate tsüanotoksiinide määramiseks. Vajadusel kasutatakse analüüsitulemuste valideerimiseks vedelikkromatograafia-massispektromeetria (LC-MS) meetodit. Antud meetodid on enimlevinud tsüanotoksiinide tuvastamiseks ning kvantifitseerimiseks. Proovide analüüsimisel rakendatakse just keemilisi meetodeid. Kuigi need on laialdaselt levinud, peidavad nad endas mitmeid probleeme. Antud meetodite rakendamiseks on vaja kallist aparatuuri ning vajaliku väljaõppega töötajaid. Võimaldades korraga määrata ainult üht tüüpi toksiooni, muudab see analüüsi kalliks. Lisaks peetakse probleemseks madalat selektiivsust ning pikka analüüsi aega [18].

1.3.4 Biokeemilised meetodid

Biokeemilised meetodid kasutavad ära tsüanotoksiinide biokeemilisi omadusi, tuvastamaks toksiooni koostist. Kasutades antikehi on võimalik tuvastada toksiooni vees lahustunud kujul ning isegi inimese vereseerumist. Ensüüm-immunosorptsioon analüüsi meetodil (ELISA) on kasutusel kas monoklonaalsed või polükonaalsed antikehad, mis tuvastavad proovis leiduvaid toksine. Antikehade eeliseks loetakse nende võimet tuvastada toksine erinevates keskkondades. Peale selle seonduvad antikehad ainult endale vastava

toksiiniga. Puuduseks antud meetodil loetakse aeg-ajalt valepositiivsete tulemuste saamist [18].

Kokkuvõtlik ülevaade eelpooltoodud meetoditest on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Tsüanotoksiinide tuvastamise meetodid.

Meetod	Eelised	Puudused	Määramis- vahemik	Viide
Mikroskoopia	Odav opereerida, kiire analüüsi vastus, võimalik määrata kvantitatiivselt	Puudub võimalus hinnata õitsemise ohtlikkust, mikroskoobi väikene eraldusvõime, rakkude ebahütlane paiknemine	Võimalik määrata alates 200 rakust	[9]
Molekulaarsed meetodid	Sensitiivne, kiire, kõrge spetsiifilisus	Vajalik valideerida teiste meetoditega	8 rakku milliliitri kohta	[9]
Keemilised meetodid	Enimlevinud meetod tuvastamiseks ja kvantifitseerimiseks	Kallis aparatuur, kvalifitseeritud töötaja vajadus, pikk analüüsi aeg	Tuvastatud kontsentratsioon alates 0,00075 µg/L	[19]
Biokeemilised meetodid	Võime tuvastada toksiine mitmetes erinevates keskkondades	Vale positiivsete tulemuste esinemine	Määramispiir alates 0,03 µg/L	[20]

Lisaks toodud meetoditele on MC-LR määramiseks välja pakutud ka mitmeid biosensoreid.

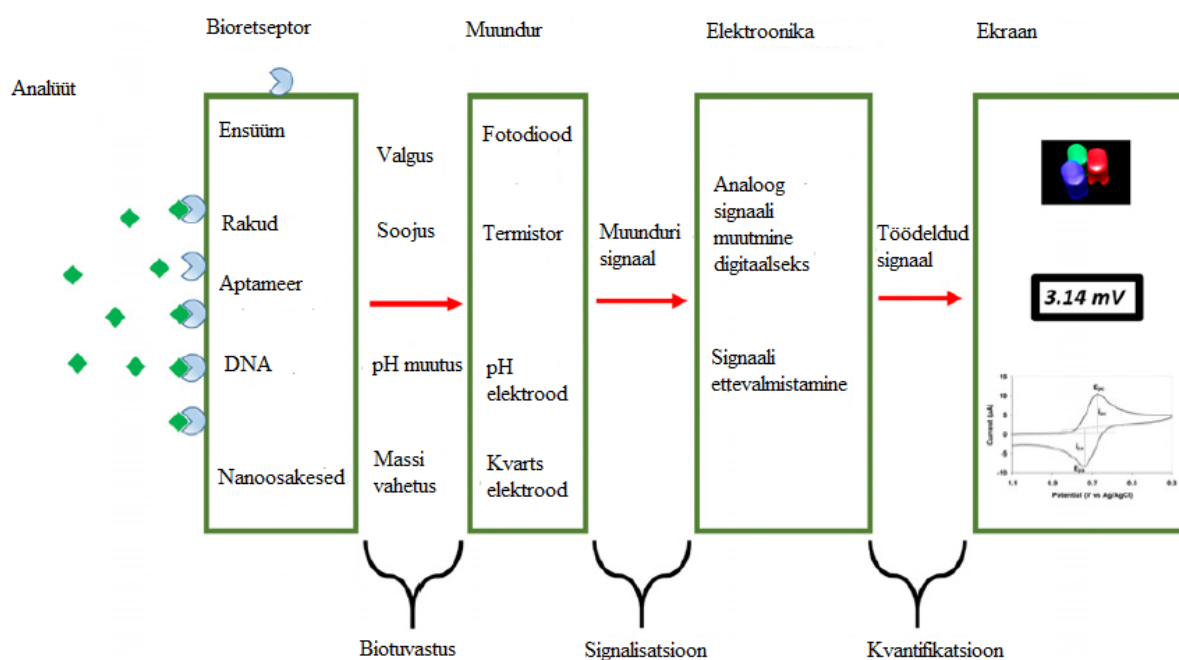
1.4 Biosensorid mikrotsüstiin-LR määramiseks

Biosensorid on analüütilised seadmed, mis võimaldavad mõõta proovis leiduva analüüdi kontsentratsiooni otse proovi maatriksis ning neid kasutatakse erinevates valdkondades, alates haiguste monitooringust meditsiinis kuni saasteainete tuvastamiseks keskkonnas. Biosensorsüsteem koosneb tavaliselt viiest erinevast komponendist, mille loetelu ja kirjeldus on toodud tabelis 2 [21].

Tabel 2. Biosensori komponentide kirjeldused [21].

Biosensori komponent	Komponendi ülesanne
Analüüt	Biosensoriga uuritav aine
Bioretseptor	Selektiivse bioloogilise komponendi tuvastamine analüüdis
Muundur	Bio-tuvastuse muutmine mõõdetavaks signaaliks
Signaali konverter	Muunduri signaali analoogvormist digitaalvormi muutmine
Ekraan	Elektroonikalt saadud signaali visualiseerimine

Võrreldes traditsiooniliste meetoditega on biosensoril mitmeid eeliseid: võimalus sooritada mitmeid mõõtmisi lühikese aja jooksul, mobiilsus, odavus, kõrge spetsiifilisus uuritava molekuli suhtes ja võime mõõta mittepolaarseid molekule [22]. Puudusteks loetakse biosensoritel keskkonnast tingitud ebastabiilsust (pH, temperatuur) [23]. Biosensori põhimõtteline skeem on toodud joonisel 2.



Joonis 2. Biosensori lihtsustatud skeem [21].

Suur osa tänapäeval välja pakutud MC-LR biosensoritest on immunosensorid ning kasutavad analüüsitava aine detekteerimiseks MC-LR vastaseid antikehi [20,24,25]. Järjest enam biosensoreid konstrueeritakse ka aptameeride baasil. Võrreldes antikehadega, on aptameeridel rohkelt eeliseid, võimaldades biosensoreid odavamalt ja lihtsamalt opereerida. Aptameeride eelised tulenevad nende madalast sünteesimise kulust. Lisaks on aptasensoritel täpsem spetsiifilisus MC-LR tuvastamiseks [26].

Aptameerid on oma ehituselt lühikesed (20-100 nukleotiidi pikad) üksikahelalised DNA või RNA molekulid, mis on võimelised seonduma endale vastavate spetsiifiliste sihtmärkidega (proteiinid) [27].

Kuigi suurem osa biosensoritest MC-LR tuvastamiseks põhinevad antikehadel, siis järjest enam hakatakse kasutama ka antikehade ja aptameeride kombinatsioone [28].

Tabelis 3 on toodud erinevate MC-LR biosensorite tähtsamad karakteristikud.

Tabel 3. Biosensorid MC-LR määramiseks.

Toksiini tuvastusmeetod	Signaali detekteerimise meetod	Avastamispiir (LOD)	Analüüsi aeg (min)	Viide
Monoklonaalne antikeha (MC8C10), MC-LR aptameer	Kapillaarne kemoluminestsents analüsaator	0,3 µg/L	<35	[29]
MC-LR Aptameer, kuld nano-osakesed	UV-nähtav spektroskoop	0,37 µg/L	30	[30]
Monoklonaalne anti-MC-LR antikeha	FOCB	0,03 µg/L	<30	[31]
Monoklonaalne anti-MC-LR antikeha	TOPA	0,03 µg/L	<20	[20]
MC-LR aptameer	Elektrokeemiline analüsaator	0,018 µg/L	120	[32]
Anti-MC-LR antikeha	CL-MADAG	0,2 µg/L	13	[24]
Monoklonaalne anti-MC-LR antikeha	Mikrovedelik kiip	0,02 µg/L	25	[33]
Magneetiline tahke faasi eraldus	HPLC-UV	0,00075 µg/L		[19]
Monoklonaalne anti-MC-LR antikeha	FPIA	0,86 µg/L		[34]

Erinevate biosensorite avastamispiirid on väga erinevad. Parimate biosensorite korral on see 0,75 ng/L, mis tähendab, et antud meetodiga on võimalik tuvastada piirmäärast 1333 korda väiksemaid kontsentratsioone kui Maailma Terviseorganisatsiooni poolt määratud 1 µg/L [1]. Analüüsi läbiviimiste aeg varieerub eri meetodeid kasutades, alates 2 tunnist lõpetades 13 minutiga, on võimalik määrata MC-LR kontsentratsioon proovis, võimaldades saada kiiresti kätte analüüsi tulemused.

2. Eksperimentaalne osa

2.1 Kasutatud reagentid

- 1) Naatriumhüdroksiid (NaOH) (AppliChem, min 99%)
- 2) Naatriumkloriid (NaCl) (Sigma-Aldrich, min 99,8%)
- 3) Epiklorohüdriin (C_3H_5ClO) (Acron Organics, 99%)
- 4) Naatriumkarbonaat (Na_2CO_3) (AppliChem, min 99,5%)
- 5) Etanoolamiin (C_2H_7NO) (Fisher Chemical, min 99%)
- 6) Sephadex G50 Medium geel (Pharmacia Fine Chemicals 50-150 μm)
- 7) Monoklonaalne anti-MC-LR antikeha (AH diagnostics, MC10E7, 200 μg)
- 8) Fluorestsentsmarkeriga konjugeeritud MC-LR spetsiifiline DNA oligomeer
5' GGC GCC AAA CAG GAC CAC CAT GAC AAT TAC CCA TAC CAC
CTC ATT ATG CCC CAT CTC CGC 3' Alexa Fluor 647N/ (Integrated DNA
Technologies)
- 9) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, 99%)
- 10) Vesinikkloriidhape (HCl) (Sigma Aldrich, 30-50%)
- 11) Naatriumdivesinikfosfaat-dihüdraat ($NaH_2PO_4 \times 2H_2O$) (AppliChem, min 99%)

2.2 Kasutatud aparatuur

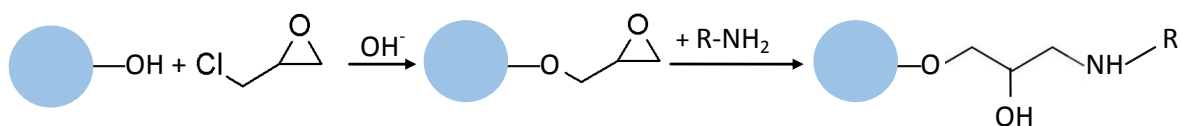
- 1) Voogsisestusanalüüsi süsteem FIALab 3500B (FIALab)
- 2) Spektrofotomeeter USB2000+ (Ocean Optics)
- 3) Valgusallikas DH-2000 UV-VIS-NIR (Ocean Optics)
- 4) Tsentrifuug Microfuge 16 (Beckman Coulter)
- 5) Loksuti S3 (ELMI)
- 6) Analüütiline kaal XS105 Dual Range, täpsusega $\pm 0,01 mg$ (Mettler Toledo)
- 7) Analüütiline kaal PB602-S/FACT, täpsusega $\pm 0,01 g$ (Mettler Toledo)
- 8) pH-meeter, täpsusega 0,2 ühikut (Mettler Toledo)

2.3 Kasutatud meetodid

2.3.1 Antikehade immobiliseerimine graanulitele

Antikehade immobiliseerimiseks kasutati varasemalt väljatöötatud protokoll [35]. Esmalt kaaluti 47,47 mg Sephadex G50 Medium graanuleid, lisati 1 ml MilliQ vett (pöördosmoosiga puhastatud vesi) ning jäeti 24 tunniks 4°C juurde punduma. Seejärel lisati 200 µl NaOH (0,4 M) lahust ning loksutati ettevaatlikult. Lisati 50 µl 99%-list epiklorohüdrini ning asetati segu toatemperatuuril 3 tunniks loksutile 130 rpm juurde. Peale inkubeerimist segu tsentrifuugiti 5 minutit 2450xG juures ning pesti läbi kaks korda 343 µl MilliQ veega ning ühe korra 343 µl Na₂CO₃ puhvriga (0,5 M, pH 9,5). Pärast iga pesu eraldati graanulid tsentrifuugimise teel (5 minutit 2450xG juures).

Antikeha lahus valmistati 110 µl Na₂CO₃ puhvriss (0,5 M, pH 9,5), kontsentratsiooniga 2 mg/ml. Seejärel segati 55 µl antikeha lahust ning 0,5 ml geeli suspensiooni. Peale selle lisati 288 µl Na₂CO₃ puhvrit (0,5 M, pH 9,5) ning asetati loksutile, 130 rpm 24 tunniks 4°C juurde inkubeerima. Peale inkubeerimist eraldati geel tsentrifuugimise teel (5 minutit 2450xG juures) ning pesti ühe korra läbi Na₂CO₃ puhvriga (0,5 M, pH 9,5). Pärast pesu eemaldati puhver, lisati 343 µl etanoolamiini lahust (85 µl/ml) Na₂CO₃ puhvriss (0,5 M, pH 9,5) ning paigutati 2 tunniks loksutile 130 rpm juurde (4°C). Pärast seda pesti suspensiooni kaks korda 343 µl MilliQ veega ning kuus korda 343 µl PBS puhvriga (10mM; 0,15 M NaCl, pH 7,2). Pesutsüklite kiirendamiseks tsentrifuugiti suspensiooni 5 minutit 2450xG juures peale lahuste lisamist. Peale pesu lõppu lisati graanulitele 343 µl PBS puhvrit (10mM; 0,15 M NaCl, pH 7,2) ning hoiustati 4°C juures kuni 1,5 kuud. Antikeha immobiliseerimise skeem on toodud joonisel 3.



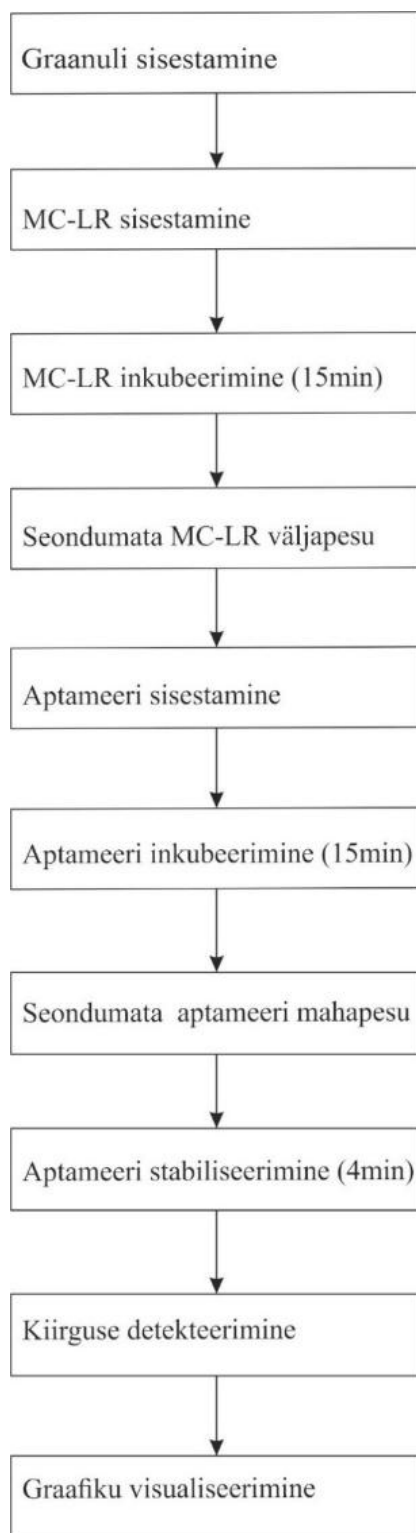
Joonis 3. Antikeha immobilisatsioon graanulile [35].

Antikeha kinnitumist graanulile kontrolliti 0,1% Coomassie Brilliant Blue lahusega enne etanoolamiini lisamist, segades 10 µl suspensiooni ja 10 µl Coomassie Brilliant Blue lahust. Lastes 10 minutit seista pesti suspensioon läbi 200 µl MilliQ veega kuniks graanuleid ümbritsev vesi oli läbipaistev.

2.3.2 Mõõtmiste läbiviimise protokoll

Enne katsete alustamist pesti mõõtmisteks kasutatav FIALab süsteemi kanalid 3 korda läbi 1000 µl PBS puhvriga (10mM; 0,15 M NaCl, pH 7,2). Sisendkanalite täitmiseks sisestati erinevatesse sisendkanalitesse 60 µl vastavaid reagente (kiirusega 2 µl/s) ning peale kõikide kanalite täitmist pesti mõõteala 3 korda läbi 1000 µl PBS puhvriga (10mM; 0,15 M NaCl, pH 7,2), kindlustamaks, et mõõterakk on puhas ning ei esine kanalite täitmise jääke.

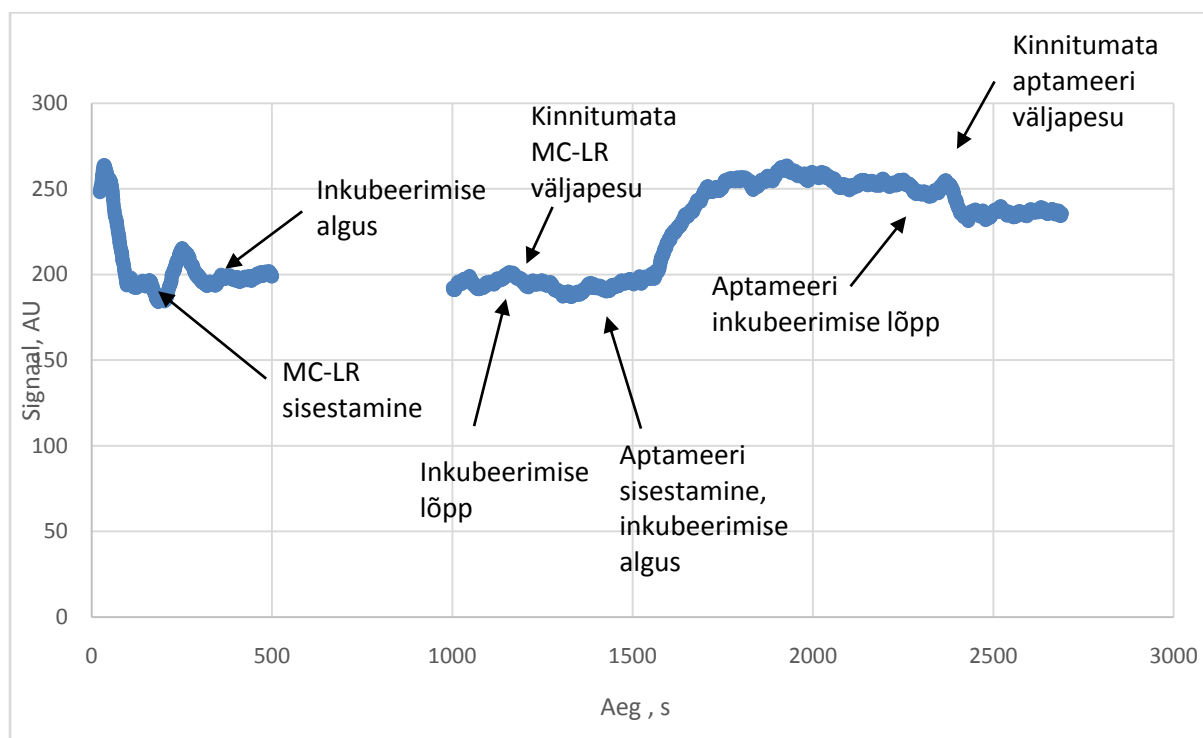
Mõõtmise läbiviimiseks sisestati antikehaga aktiveeritud 20 µl Sephadex G50 Medium graanuleid kiirusega 2 µl/s ning seejärel lisati 30 µl PBS puhvrit (10mM; 0,15 M NaCl, pH 7,2), kiirusega 2 µl/s moodustades mikrokoloni (voolukanalu ots suleti niimoodi, graanulid erinevalt lahusest läbi ei pääsenud). Peale kolonni tekkimist lisati 150 µl MC-LR sisaldavat proovi kiirusega 2 µl/s ning lasti inkubeerida 15 minutit. Inkubatsiooniaja lõppedes pesti seondumata MC-LR maha 150 µl PBS puhvriga (10mM; 0,15 M NaCl, pH 7,2) kiirusega 2 µl/s. Mõõtmiseks voolutati 20 µl aptameeri lahust (kontsentratsiooniga 0,033 mg-0,1 mg/L) kiirusega 1 µl/s mõõtealasse, ning lasti sellel 15 minutit inkubeerida. Toksiiniga mitte seondunud aptameerid pesti 150 µl PBS puhvriga (10mM; 0,15 M NaCl, pH 7,2) kiirusega 2 µl/s mõõtealast välja ning järgnevalt oodati 4 minutit, millega tagati signaali stabiliseerimine. Erinevate kontsentratsioonide mõõtmiseks pesti analüüti sisaldav kanal 1000 µl PBS puhvriga (10mM; 0,15 M NaCl, pH 7,2) kiirusega 50 µl/s, tagamaks, et eelnevalt mõõdetud proove ei esineks kanalis. Mõõteprotsessi kokkuvõtlik skeem on toodud joonisel 4.



Joonis 4. Mõõteprotsessi skeem.

2.3.4. Biosensori signaali detekteerimine

Seondunud aptameeri detekteerimiseks registreeriti süsteemi fluorestsentssignaal lainepikkusel 670 nm enne ja pärast fluorestsentsmärgisega aptameeri lisamist ning saadud signaalide vahe kasutati biosensorsüsteemi vastussignaalina. Biosensori signaali profiil koos erinevate reagentide sisestusaegadega on toodud joonisel 5.



Joonis 5. Biosensori signaali muutumine ajas.

Graanulite sisestamine mõõtealasse põhjustab muutuse baasjoones, mis on tingitud valgusallikalt tuleneva valguse peegeldumisest graanulite pinnalt ja moodustab süsteemi taustsignaali. Peale kolonni moodustamist graanulid pakitakse tihedalt kokku, et nende liikumine oleks minimaalne ning need ei mõjutaks signaali käiku mõõtmise ajal. MC-LR sisestamine mõõtealasse põhjustab mõõtealal hüdraulilise šoki, mistõttu toimub lühiajaline signaali suurenemine graanulite liikumise tõttu ning selle lõppedes stabiliseerub signaal endisel tasemel. MC-LR inkubeeritakse 15 minutit, et tagada toksiini kinnitumine antikeha külge ning inkubeerimisaja lõppedes pestakse seondumata MC-LR mõõtealast välja, välistades võimaluse, et aptameerid seonduvad toksiini molekuliga, mis ei ole kinnitunud antikeha külge. Aptameeri inkubatsiooniks arvestati 15 minutit, mis tagas piisava aja

aptameeridele, et kinnituda MC-LR külge. Kinnitumata aptameeride väljapesu võimaldab registreerida signaali intensiivsuse, mida emiteerivad MC-LR molekuli külge seondunud aptameerid. Signaali stabiliseerimise eesmärk on tagada ühtlane nivoo, mis võimaldab arvutada signaali muutuse, mis on saadud aptameeri lisamisel proovile.

3. Tulemused ja arutelu

3.1 Biosensorsüsteemi disainimine MC-LR määramiseks

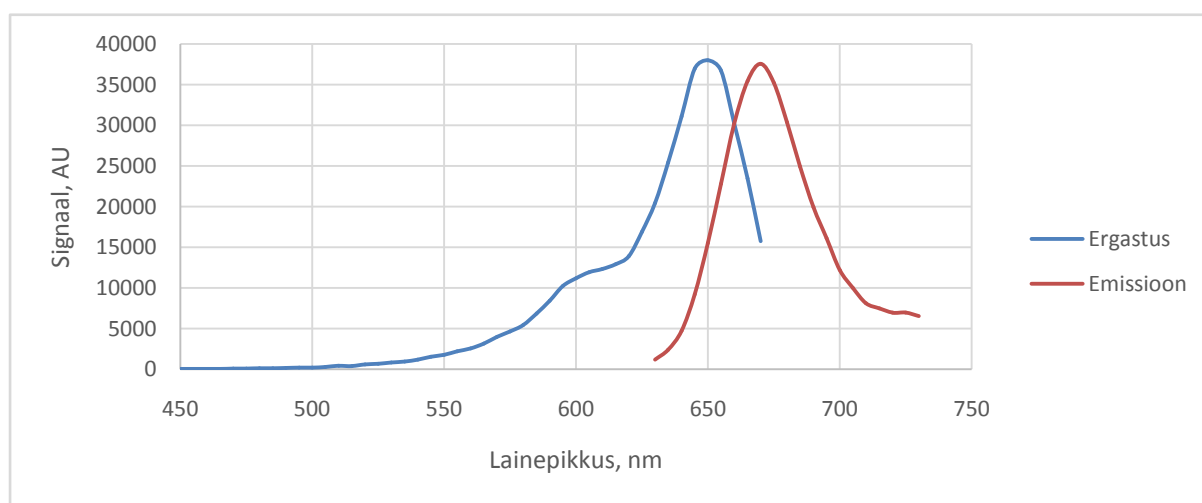
Loodavas biosensorsüsteemis, mis on mõeldud MC-LR määramiseks on rakendatud immunobioäratundmise põhimõtet. Antikeha – aptameer süsteemil põhinev biosensori konstrueerimisel võeti kasutusele MC-LR määramiseks monoklonaalne anti-MC-LR antikeha ning lisaks MC-LR spetsiifiline aptameer. Varasemalt on uuritud antikeha ja aptameeri sidumiskohtade kattumise võimalust MC-LR molekulil. Avastati, et hoolimata toksiini suhteliselt väikesest molekulaarmassist ($M = 995 \text{ g/mol}$), ei kattu nende sidumiskohad toksiini molekulil, võimaldades nii antikehal kui ka aptameeril toksiiniga seonduda [29]. Disainitavas biosensoris rakendatakse BIA süsteemi, kus monoklonaalne antikeha immobiliseeritakse graanulitele, mida kasutatakse mikrokoloni moodustamisel. Analüüdi sisestamisel süsteemi, seonduvad MC-LR molekulid graanulitel asetsevate antikehadega, tagades võimaluse proovi hilisemalt kontsentreerida kui ka maatriksit eraldada. Graanulitele seondunud MC-LR määramiseks kasutatakse biosensorsüsteemis fluorestsentsmarkeriga (Alexa Fluor 647) konjugeeritud MC-LR spetsiifilist DNA oligomeeri. Detekteerides fluorestsentsi intensiivust peale seondumata markeri väljapesu erinevatel MC-LR kontsentratsioonidel on võimalik koostada kalibreerimisgraafik, mille alusel saab määrata tundmatu kontsentratsiooniga proove.

Biosensorsüsteemis võeti kasutusele monoklonaalsed antikehad, võrreldes polükloonaalsete antikehadega on need spetsiifilisemad, omavad võimet proteiine kvantifitseerida proovides ning antikehad on homogeensemad [38].

3.1.1 Aptameeriga seotud fluorestsentsmarkeri AlexaFluor 647 spektrite määramine

Töös kontrolliti aptameeriga konjugeeritud fluorestsentsmarketite spektrite vastavust kirjanduses toodule [36], sest markerite konjugeerimisel võib esineda ergastus- ja emissioonspektrite maksimumide nihkeid [37]. Saadud spektrid on toodud joonisel 6.

Leiti, et ergastusmaksimum asub 650 nm ja emissioonimaksimum asub 670 nm peal, mis on vastavuse kirjanduses toodud andmetega [36]. Kasutatud fluorofoor Stokes'i nihe suuruseks on 20 nm. Saadud tulemusi kasutati biosensorsüsteemi valgusallika seadistamisel mõõteprotsesside tarbeks.



Joonis 6. Aptameeri ergastus ning emiteerimis maksimum.

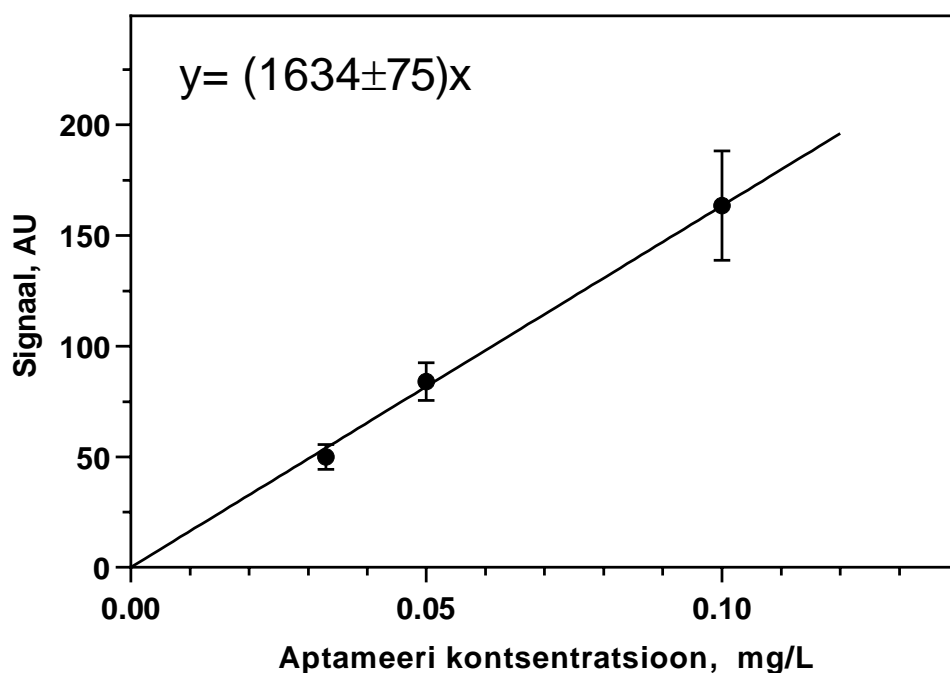
3.2 Mõõteprotokolli optimeerimine

Kuna töögrupis pole varasemalt aptameeridel põhinevate biosensorite uurimisega tegeldud, siis esmalt modifitseeriti voogsisestussüsteemil ja detekteerivate antikehade kasutamisel põhineva biosensorsüsteemi mõõteprotokolli, et biosensorsüsteemi oleks võimalik rakendada MC-LR määramiseks.

3.2.1 Aptameeri kontsentratsiooni optimeerimine

Mõõtmiste optimeerimiseks kontrolliti kõigepealt signaali sõltuvust aptameeri kontsentratsioonist (joonis 7). Mõõtmised sooritati kolmel erineval aptameeri kontsentratsioonil - 0,1 mg/L, 0,05 mg/L ning 0,033 mg/L. Biosensorsüsteemi

väljundsignaali põhjal arvutati mõõtmise keskmine tulemus ning hälbed ja koostati graafik, signaali ja kontsentratsiooni sõltuvuse kohta (joonis 7).

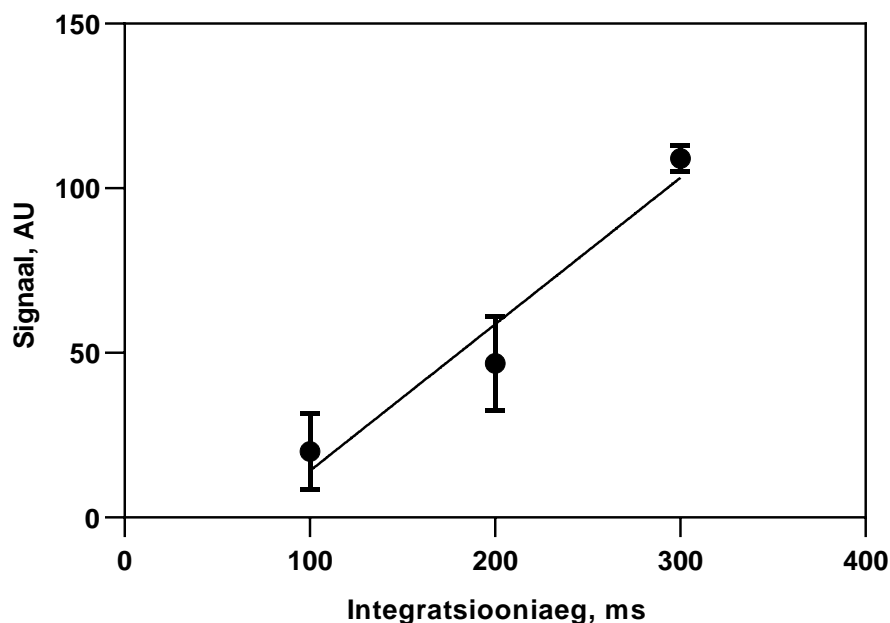


Joonis 7. Signaali sõltuvus aptameeri kontsentratsioonist.

Jooniselt 7 väljendub, et sensorsüsteemi väljundsignaal sõltus aptameeri kontsentratsiooni suhtes lineaarselt. Edasises töös kasutati aptameeri kontsentratsiooni 0,05 mg/L, mis on optimaalne, et saada piisav signaali suurus võimalikult väikse reagenti kuluga.

3.2.2 Biosensori väljundsignaali sõltuvus mõõdetava signaali detekteerimise ajast

Optimaalse signaali detekteerimise aja leidmiseks katsetati kolme erinevat signaali integratsiooniaega ning koostati graafik, mis iseloomustab väljundsignaali sõltuvust integratsiooniajast (vt. joonis 8). Integratsiooniaeg määrab ära signaali integreerimise aja detektoris.

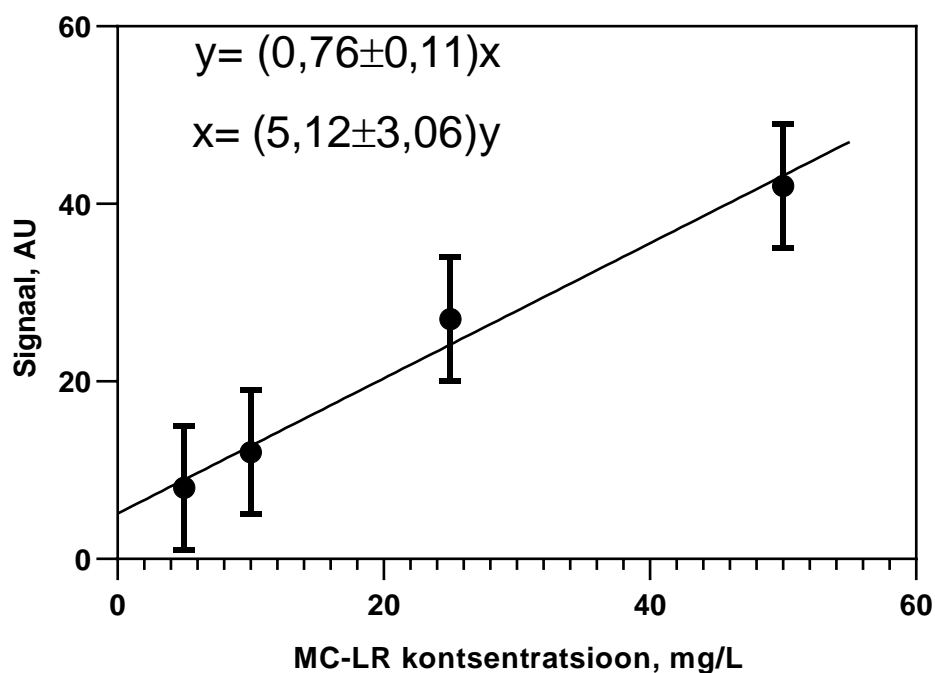


Joonis 8. Signaali muut sõltuvalt integratsiooniajast.

Joonisel 8 toodud graafikult selgub, et signaali suurus sõltub integratsiooniajast lineaarselt. Saadus signaali väärtuste põhjal valiti integratsiooniajaks 300 ms, omades signaali kõikumise amplituudi vaid $\pm 3,9$ ühikut. Lühema integratsiooniaja kasutamine põhjustas taustsignaali kõikumise amplituudi kasvu vähemal määral kui üle 300 ms integratsiooniaja kasutamine. Taustsignaali kõikumise amplituudi kasvuga intensiivistub mõõtmisprotsessidel tekkiv müra, mis raskendab proovide mõõtmisel korrektsete tulemuste saamist.

3.3 Mikrotsüstiin-LR kontsentratsiooni määramine

Sensorsüsteemi töö kontrollimiseks testiti süsteemi kasutades mõõtmisteks erinevaid MC-LR kontsentratsioone. MC-LR kontsentratsiooni varieeriti vahemikus 5 – 50 mg/L. Mõõtmistulemused on esitatud joonisel 9.



Joonis 9. Biosensori signaali sõltuvus MC-LR kontsentratsioonist.

Jooniselt 9 on näha, et biosensori väljundsignaal sõltub MC-LR kontsentratsioonist lineaarselt, kusjuures kalibreerimisgraafiku tõus, mis iseloomustab biosensori tundlikkust, on $0,76 \pm 0,11$ AU*L/mg. Süsteemi taustasignaali väärtus oli $5,1 \pm 3$ AU. Saadud tulemuste põhjal on võimalik eeldada, et antikeha-aptameer kombinatsiooniga biosensor suudab tuvastada MC-LR toksiini kontsentratsioone proovides, MC-LR avastamispiir suhteliselt kõrge, 26 mg/L. Mõõtmistulemuste tundlikumaks muutmiseks on vajalik muuta parameetreid, mis antud protsessid kasutusel olid. Eelkõige tuleb rõhku pöörata inkubatsiooniaegadele, aga ka antikeha ning aptameeri kontsentratsioonidele lahuses.

Kuna sinivetikate esinemine sõltub ilmastiku tingimustest ja vees leiduvatest ühenditest, siis on vajalik, et arendatava biosensoriga oleks võimalik detekteerida ka väiksemate kontsentratsioonide esinemist proovides. Looduslikes veekogudes esineb MC-LR kontsentratsioonide amplituudi kõikumine nii sesoonses kui ka tsirkaadses lõikes. Ühe ööpäeva jooksul on täheldatud, et toksiini kontsentratsioon võib öösiti olla 6 korda väiksem võrreldes päevase ajaga [39].

Eesmärgiks on, et antud süsteemiga oleks võimalik vähemalt $1 \mu\text{g/L}$ kontsentratsioone mõõta, mis ühtib Maailma Terviseorganisatsiooni poolt ette antud piirmääradega [1].

Biosensorsüsteemi on vaja kindlasti muuta tundlikumaks, et sellega oleks võimalik mõõta mitmeid suurusjärke väiksemaid MC-LR kontsentratsioone proovides. Süsteemi sensitiivsuse tõstmiseks peaks esmalt optimeerima antikeha ning toksiini kontsentratsioonide omavahelist suhet. Samuti on vajalik leida kõige optimaalsem MC-LR ning aptameeride suhe ning aptameeride inkubeerimisaeg. Liiga pika inkubatsiooniajaga suureneb tõenäosus, et aptameeride fluorestsentsmarkerid pleekuvad. Pika inkubatsiooniaja jooksul on tõenäolisem, et aptameerid lagunevad DNA nukleaasi toimel [40]. Lisaks on vaja leida kõige optimaalsem väljapesu kiirus, elimineerides võimaluse, kus toksiin või aptameerid pestakse graanulitelt maha.

Töös konstrueeritud biosensor jäi oma mõõtmistulemustega alla kirjanduses kirjeldatud süsteemidele [29,32]. Kuna varem ei oldud töögrupis aptameeri põhiste biosensoritega tegeletud, siis esines mitmeid kitsaskohti süsteemi tundlikumaks muutmisel. Töös kirjeldatud süsteemi on võimalik täiustada, optimeerides inkubatsiooniaegu, lahuste kontsentratsioone ja väljapesu kiirust, võimaldades süsteemi tundlikumaks muuta.

Kokkuvõte

Käesolevas bakalaureusetöös konstrueeriti antikeha-aptameer tuvastusmeetodil põhinev biosensor mikrotsüstiin-LR määramiseks ning optimeerida mõõtmismetoodikat.

Mikrotsüstiin-LR on tsüanobakterite perekonna *Microcystis* poolt enimtoodetud toksiin, mis esineb sinivetikate õitsemise ajal. Keemiliselt väga stabiilne ning poolestusajaga kuni 120 päeva, kujutab MC-LR endast ohtu ka pikalt peale tsüanobakterite massilist vohamist veekogudes. MC-LR, olles hepatotoksiin, kahjustab see organismi sattumisel maksarakke ning halvimal juhul võib tekitada maksapuudulikkuse.

Biosensori konstrueerimine algas kasutatava aptameeri kontsentratsiooni optimeerimisega. Kasutades erinevaid aptameeride kontsentratsioone koostati esiteks signaali ning aptameeri omavaheline sõltuvusgraafik, mille põhjal otsustati aptameeri kontsentratsioon järgnevateks katseteks. Otsuse tegemisel võeti arvesse nii signaali intensiivsus kui ka aptameeride kontsentratsioon. Mõõtmisteks kõige optimaalsema integratsiooniaja leidmiseks testiti kolme erinevat integratsiooniaega. Valikut tehes võeti arvesse nii signaali tugevus, mis oli arvutatud puhta aptameeri lahuse mõõtesignaali ning integratsiooniaja taustsignaali vahena, kui ka signaali amplituudi kõikumist.

Leiti lineaarne sõltuvus MC-LR kontsentratsiooni ning signaali vahel, tõestades et antikeha-aptameer baasil põhinev biosensor mikrotsüstiin-LR määramiseks on võimalik.

Kuigi katsetega loodi baas uuele biosensor tehnoloogiale, siis tulevikus peab antud tehnoloogiat täiustama, muutes sensori tundlikumaks, et oleks võimalik määrata Maailma Terviseorganisatsiooni poolt ette antud piirmäär 1 µg/L.

Summary

Biosensor for the detection of cyanobacterial toxin microcystin-LR

The aim of this work was to construct an antibody-aptamer based biosensor for the detection of cyanobacterial toxin microcystin-LR and to optimize the systems measurement methodology.

Microcystin-LR produced by the phytoplankton family *Microcystis* is the most produced toxin that occurs during algal blooms. Chemically stable and with a half-life up to 120 days is still a threat even after the algal bloom has ended. Microcystin-LR, classified as a hepatotoxin, causes damage to liver cells, and the worst-case scenario can end with the liver failure.

Biosensor construction began when the aptamer concentration was optimized. By using different aptamer solution concentrations, a graph was constructed to determine the aptamer solution concentration, which will be used in following tests. Signal intensity and aptamer concentration were taken into consideration when the decision was made. To determine the integration time, three different integration times were tested. The signal amplitude fluctuation and the signal intensity, which was calculated as the integration time baseline intensity were taken into account when making the decision and extracted from the signal intensity gotten from pure aptamer solution.

A linear dependence was found between the concentration of MC-LR and the signal, proving that the antibody-aptamer based biosensor technology can determine the concentration of microcystin-LR.

Even though the base for new biosensor technology was founded, the technology must be improved in the future by making the sensor more sensitive and to meet the guideline value determined by the World Health Organization of 1 µg/L.

Kasutatud kirjandus

- [1] Ian Falconer, Jamie Bartram, Ingrid Chorus, Tine Kuiper-Goodman, Hans Utkilen, Mike Burch, Geoffrey A. Codd, *Chapter 5. Safe Levels and Safe Practices*, https://www.who.int/water_sanitation_health/resourcesquality/toxycyanchap5.pdf, (vaadatud Mai 30, 2019)
- [2] Terviseamet, *Sinivetikad_ehk_tsueanobakterid*, https://www.terviseamet.ee/sites/default/files/Keskkonnatervis/sinivetikad_ehk_tsueanobakterid.pdf, 2016, (vaadatud Apr 10, 2019)
- [3] Diersing, N. Phytoplankton Blooms: The Basics. 2.
- [4] *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring, and Management*; Chorus, I., Bartram, J., Eds.; E & FN Spon: London ; New York, 1999.
- [5] Merel, S.; Walker, D.; Chicana, R.; Snyder, S.; Baurès, E.; Thomas, O. State of Knowledge and Concerns on Cyanobacterial Blooms and Cyanotoxins. *Environment International* **2013**, 59, 303–327. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.013>.
- [6] Issa, A. A.; Abd-Alla, M. H.; Ohyama, T. Nitrogen Fixing Cyanobacteria: Future Prospect. *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation* **2014**. <https://doi.org/10.5772/56995>.
- [7] Laugaste, R. Sinivetikad: kes nad on ja miks nad on ohtlikud. 36.
- [8] Cyanobacteria (Blue-green algae) and Cyanobacterial Blooms <https://www.lgsonic.com/blogs/cyanobacteria/> (vaadatud Apr 10, 2019).
- [9] Sanseverino, I.; Loos, R.; Lettieri, T.; Conduto António, D.; European Commission; Joint Research Centre. *Cyanotoxins Methods and Approaches for Their Analysis and Detection*.; 2017.
- [10] Czaja, M. J. Hepatotoxins. In *Encyclopedia of Gastroenterology*; Johnson, L. R., Ed.; Elsevier: New York, 2004; pp 365–367. <https://doi.org/10.1016/B0-12-386860-2/00367-1>.
- [11] McElhiney, J.; Lawton, L. A. Detection of the Cyanobacterial Hepatotoxins Microcystins. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2005**, 203 (3), 219–230. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.06.002>.

- [12] Bostan, H. B.; Taghdisi, S. M.; Bowen, J. L.; Demertzis, N.; Rezaee, R.; Panahi, Y.; Tsatsakis, A. M.; Karimi, G. Determination of Microcystin-LR, Employing Aptasensors. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *119*, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.003>.
- [13] PubChem. Microcystin-LR <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/445434> (vaadatud Apr 11, 2019).
- [14] The highly toxic microcystin-LR variant. The microcystin chemical. https://www.researchgate.net/figure/The-highly-toxic-microcystin-LR-variant-The-microcystin-chemical-structure-can-be_fig1_5937325 (vaadatud Apr 10, 2019).
- [15] Lawton, L. A.; Robertson, P. K. J. Physico-Chemical Treatment Methods for the Removal of Microcystins (Cyanobacterial Hepatotoxins) from Potable Waters. *Chemical Society Reviews* **1999**, *28* (4), 217–224. <https://doi.org/10.1039/a805416i>.
- [16] Isolation and characterization of Lake Erie bacteria that degrade the cyanobacterial microcystin toxin MC-LR | Elsevier Enhanced Reader <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0380133018301977?token=E201E25A59D038D7F0BA5F6A980E24F8D4FC6047BEFB4DE2686177D2051B4790CD1931E7285C8468B793E754667B3EA4> (vaadatud Apr 11, 2019). <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2018.10.013>.
- [17] Liu, Y.; Ren, J.; Wang, X.; Fan, Z. Mechanism and Reaction Pathways for Microcystin-LR Degradation through UV/H₂O₂ Treatment. *PLoS One* **2016**, *11* (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156236>.
- [18] Moreira, C.; Ramos, V.; Azevedo, J.; Vasconcelos, V. Methods to Detect Cyanobacteria and Their Toxins in the Environment. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2014**, *98* (19), 8073–8082. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5951-9>.
- [19] Lian, L.-L.; Guo, T.-X.; Wu, Y.-Q.; Jin, L.; Lou, D.-W.; Sun, D.-Z. Determination of Microcystin-LR in Environmental Water by Magnetic Solid Phase Extraction-High Performance Liquid Chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **2015**, *43* (12), 1876–1881. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(15\)60884-2](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(15)60884-2).
- [20] Long, F.; He, M.; Zhu, A. N.; Shi, H. C. Portable Optical Immunosensor for Highly Sensitive Detection of Microcystin-LR in Water Samples. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24* (8), 2346–2351. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.12.003>.

- [21] Bhalla, N.; Jolly, P.; Formisano, N.; Estrela, P. Introduction to Biosensors. *Essays Biochem* **2016**, *60* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>.
- [22] Biosensor Technology: Advantages and Applications
<https://www.azosensors.com/article.aspx?ArticleID=402> (vaadatud Apr 18, 2019).
- [23] Table 9: Advantages and disadvantages of biosensor systems
https://www.researchgate.net/figure/Advantages-and-disadvantages-of-biosensor-systems_tbl5_317213811 (vaadatud Apr 18, 2019).
- [24] Lindner, P.; Molz, R.; Yacoub-George, E.; Wolf, H. Rapid Chemiluminescence Biosensing of Microcystin-LR. *Analytica Chimica Acta* **2009**, *636* (2), 218–223. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.01.061>.
- [25] Ruiyi, L.; Qianfang, X.; Zaijun, L.; Xiulan, S.; Junkang, L. Electrochemical Immunosensor for Ultrasensitive Detection of Microcystin-LR Based on Graphene–Gold Nanocomposite/Functional Conducting Polymer/Gold Nanoparticle/Ionic Liquid Composite Film with Electrodeposition. *Biosensors and Bioelectronics* **2013**, *44*, 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.01.007>.
- [26] Zhao, L.; Huang, Y.; Dong, Y.; Han, X.; Wang, S.; Liang, X. Aptamers and Aptasensors for Highly Specific Recognition and Sensitive Detection of Marine Biotoxins: Recent Advances and Perspectives. *Toxins* **2018**, *10* (11), 427. <https://doi.org/10.3390/toxins10110427>.
- [27] Aptamer chemistry - ScienceDirect
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X18300590> (vaadatud Apr 30, 2019).
- [28] Song, K.-M.; Lee, S.; Ban, C. Aptamers and Their Biological Applications. *Sensors (Basel)* **2012**, *12* (1), 612–631. <https://doi.org/10.3390/s120100612>.
- [29] Xiang, A.; Lei, X.; Ren, F.; Zang, L.; Wang, Q.; Zhang, J.; Lu, Z.; Guo, Y. An Aptamer-Based Immunoassay in Microchannels of a Portable Analyzer for Detection of Microcystin-Leucine-Arginine. *Talanta* **2014**, *130*, 363–369. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.008>.
- [30] Li, X.; Cheng, R.; Shi, H.; Tang, B.; Xiao, H.; Zhao, G. A Simple Highly Sensitive and Selective Aptamer-Based Colorimetric Sensor for Environmental Toxins Microcystin-LR in Water Samples. *Journal of Hazardous Materials* **2016**, *304*, 474–480. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.11.016>.

- [31] Yang, R.; Song, D.; Fang, S.; Liu, Y.; Zhou, X.; Long, F.; Zhu, A. Development of Novel Portable and Reusable Fiber Optical Chemiluminescent Biosensor and Its Application for Sensitive Detection of Microcystin-LR. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *121*, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.062>.
- [32] Lin, Z.; Huang, H.; Xu, Y.; Gao, X.; Qiu, B.; Chen, X.; Chen, G. Determination of Microcystin-LR in Water by a Label-Free Aptamer Based Electrochemical Impedance Biosensor. *Talanta* **2013**, *103*, 371–374. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.081>.
- [33] Zhang, J.; Liu, S.; Yang, P.; Sui, G. Rapid Detection Of algal Toxins by Microfluidic Immunoassay. *Lab Chip* **2011**, *11* (20), 3516–3522. <https://doi.org/10.1039/C1LC20516A>.
- [34] Zhang, H.; Yang, S.; Beier, R. C.; Beloglazova, N. V.; Lei, H.; Sun, X.; Ke, Y.; Zhang, S.; Wang, Z. Simple, High Efficiency Detection of Microcystins and Nodularin-R in Water by Fluorescence Polarization Immunoassay. *Analytica Chimica Acta* **2017**, *992*, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.09.010>.
- [35] Kivirand, K, Labori eeskiri: "Immobilization of antibodies onto Sephadex gel", 2018, lubatud töögrupil kasutada
- [36] Integrated DNA Technologies
<https://eu.idtdna.com/site/Catalog/Modifications/Product/1678> (vaadatud Mai 29, 2019).
- [37] Aneja, A.; Mathur, N.; Bhatnagar, P. K.; Mathur, P. C. Triple-FRET Technique for Energy Transfer Between Conjugated Polymer and TAMRA Dye with Possible Applications in Medical Diagnostics. *J Biol Phys* **2008**, *34* (5), 487–493. <https://doi.org/10.1007/s10867-008-9107-y>.
- [38] Polyclonal vs Monoclonal Antibodies
<https://www.pacificimmunology.com/resources/antibody-introduction/polyclonal-vs-monoclonal-antibodies/> (vaadatud Apr 24, 2019).
- [39] World Health Organization, *Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in Drinking-water*, Geneva, 1998
- [40] Nuclease - an overview | ScienceDirect Topics
<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/nuclease> (vaadatud Jun 2, 2019).

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Rain Laidma,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Biosensor sinivetika toksiini mikrotsüstiin-LR määramiseks,

mille juhendajad on Toonika Rincken, Edith Viirlaid ja Eerik Jõgi,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Rain Laidma

30.05.19